

Requested Patent: JP1083093A

Title: PROTECTED BIOTIN DERIVATIVES. ;

Abstracted Patent: EP0305201, A3, B1 ;

Publication Date: 1989-03-01 ;

Inventor(s): EDGE MICHAEL DEREK ;

Applicant(s): ICI PLC (GB) ;

Application Number: EP19880307934 19880826 ;

Priority Number(s): GB19870020394 19870828 ;

IPC Classification: C07D495/04 ; C07F9/65 ; C07H21/00 ; C12Q1/68 ;

Equivalents:

AU2113188, AU614764, CA1340343, DE3855693D, DE3855693T, DK477488,
FI883931, JP2746934B2, NO883822, NZ225944, PT88347, US5247081,
ZA8806215

ABSTRACT:

Processes for the preparation of biotinylated polynucleotides and analogues thereof and protected intermediate products for use in such processes are described and claimed. The processes may be conveniently used in the automated synthesis of biotinylated polynucleotide on a DNA synthesiser. The polynucleotides so prepared may be used as labelled probes e.g. as diagnostic tools for clinical and research uses.

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-83093

⑤Int.Cl.⁴
C 07 H 21/00
// C 12 Q 1/68

識別記号 庁内整理番号
7417-4C
A-6807-4B

④公開 昭和64年(1989)3月28日

審査請求 未請求 請求項の数 16 (全 23 頁)

⑭発明の名称 保護されたビオチン誘導体

⑯特 願 昭63-214758

⑰出 願 昭63(1988)8月29日

優先権主張 ⑱1987年8月28日⑲イギリス(GB)⑳8720394

⑲発 明 者 マイケル・デレク・エ イギリス国チエシャー州コングリトン、イユード・ウエ
ツジ イ 6
⑲出 願 人 インベリアル・ケミカ イギリス国ロンドン市エスダブリュー1ビー・3 ジエイエ
ル・インダストリー フ、ミルバンク、インベリアル・ケミカル・ハウス(番地
ズ・ビーエルシー なし)
⑲代 理 人 弁理士 湯浅 恭三 外3名

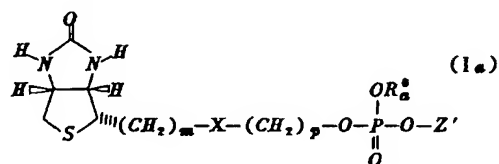
明 細 書

1. [発明の名称]

保護されたビオチン誘導体

2. [特許請求の範囲]

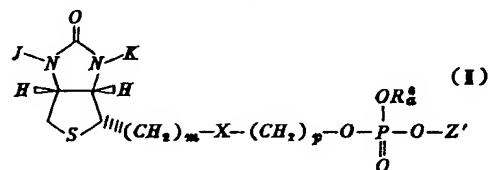
1. 式 I a



[式中、 m は 4 または 5 であり、 X は直接結合、 $-O-P(O)(OR_a)-O-$ 、 $-S-$ 、 $-O-$ 、 $-CONH-$ 、 $-NHCONH-$ または $N-R^a$ (R^a は直鎖または分枝鎖 C_{1-10} アルキル基を表わす) を表わし、 p は 0 ~ 16 の整数であり、ただし X が直接結合以外のものである場合、 p は少なくとも 2 の整数であり、 R_a は水素原子またはホスフェート保護基を表わし、 Z' は保護されていない形の、または塩基および/またはホスフェート部分が保護基を有する形のヌクレオチド配列を表わし、該ヌクレオ

(1)

チド鎖は支持体に結合していてもよい] の化合物またはそれらのイソ同族体の製法であつて、式 II



[式中、 m 、 p 、 X 、 R_a および Z' は上記に定めたものであり、 J および K は同一でも異なつてもよく、それぞれ水素原子を表わすか、またはヌクレオチドリン酸化と適合性であり、化合物の親油性を高める保護基を表わし、 J および K のうち少なくとも一方は水素原子以外のものである] の化合物またはそれらのイソ同族体を脱保護し；これにより水素原子以外の J または K 基を除去して式 I a またはそれらのイソ同族体を得ることによる方法。

2. J および K がテトラヒドロピラニル、フリル、ジメトキシトリチル、キサントニル、テトラヒドロチオピラニル、ベンゾイルまたはアシ

(2)

ル基を表わす、請求項1に記載の方法。

3. R^a が水素原子、メチル、2-シアノエチル、2-クロルフエニル、2,2,2-トリハロ-1,1-ジメチルエチル、5-クロルキノリン-8-イル、2-メチルチオエチル、またはフエニル環においてハロゲン原子もしくは NO_2 により置換されていてもよい2-フエニルチオエチル基を表わす、請求項1または2に記載の方法。

4. J および/または K がテトラヒドロピラン-2-イル、6-メトキシ-テトラヒドロピラン-2-イル、またはジメトキシトリチルを表わす、請求項1ないし3のいずれかに記載の方法。

5. J および K の一方のみが保護基を表わし、 J および K の他方が水素原子を表わす、請求項1ないし4のいずれかに記載の方法。

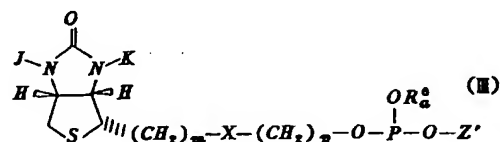
6. 請求項1ないし5のいずれかに記載の式Ⅲの化合物またはそれらのイソ同族体の製法であつて、式Ⅲ

(3)

(式中、 J 、 K 、 m 、 p および X は上記において定めたものであり、 R^a および R^b は同一でも異なつてもよく、それぞれ C_{1-10} の直鎖もしくは分枝鎖アルキル基であるか、または R^a と R^b はそれらの間にある窒素原子と共に、異種原子1、2、3または4個を含む5〜7員複素環を表わし、窒素原子のほか存在する異種原子は酸素、窒素およびイオウから選ばれ、 R^a は上記において定めた R^b に対応するが、ただし水素原子以外のものである)の化合物またはそれらのイソ同族体を、上記において定めた基 Z' のヌクレオチド配列に対応するが、ただし式Ⅳの化合物への付着位置においては保護されておらず、このためこの位置での結合が可能である式 Z' のヌクレオチド配列と結合させ、これにより式Ⅲの化合物またはそれらのイソ同族体を得ることとなる方法。

9. 前配式Ⅲ〔式中、 J 、 K 、 m 、 p 、 X 、 R^a および Z' は請求項1ないし5のいずれかに記載の意味を有する〕の化合物またはそれらのイソ同族体。

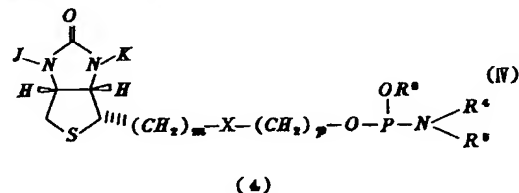
(5)



〔式中、 m 、 p 、 J 、 K 、 Z' 、 X および R^a は上記において定めたものである〕の化合物またはそれらの同族体を酸化することとなる方法。

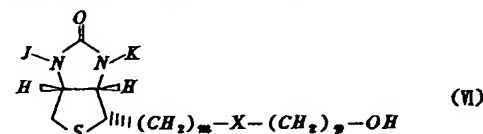
7. 前配式Ⅲ〔式中、 m 、 p 、 X 、 R^a 、 Z' 、 J および K は請求項1ないし6のいずれかに記載の意味を有する〕の化合物またはそれらのイソ同族体。

8. 前配式Ⅲ〔式中、 J 、 K 、 m 、 p 、 X 、 R^a および Z' は請求項1ないし5のいずれかに記載の意味を有する〕の化合物またはそれらのイソ同族体の製法であつて、式Ⅳ



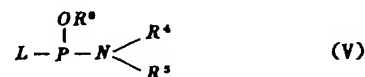
(4)

10. 前配式Ⅳ〔式中、 J 、 K 、 m 、 p 、 X 、 R^a 、 R^b および R^c は請求項1ないし5のいずれかに記載の意味を有する〕の化合物またはそれらのイソ同族体の製法であつて、式Ⅴ



(VI)

〔式中、 J 、 K 、 m 、 p および X は上記において定めたものである〕の化合物またはそれらのイソ同族体を式Ⅴ



(V)

〔式中、 R^a 、 R^b および R^c は上記において定めたものであり、 L は置換可能な基である〕の化合物と反応させ、これにより式Ⅳの化合物またはそれらのイソ同族体を形成させることとなる方法。

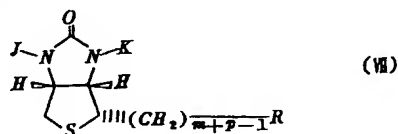
11. 前配式Ⅳ〔式中、 J 、 K 、 m 、 p 、 R^a 、 R^b 、 R^c および X は請求項1ないし5のいずれかに配

(6)

載の意味を有する]の化合物またはそれらのイソ同族体。

12. 前配式Ⅶ〔式中、 J 、 K 、 m 、 p および X は請求項1ないし5のいずれかに記載の意味を有する]の化合物またはそれらのイソ同族体の製法であつて、

(a) X が直接結合を表わす場合、対応する一般式Ⅷ



〔式中、 J 、 K 、 m および p は上記において定めたものであり、 R は対応するアルコール類に還元しうる基を表わす]の化合物またはそれらのイソ同族体を還元し、これにより式Ⅶの化合物またはそれらのイソ同族体を形成させ、

(b) X が $-O-P(O)(OR^{\#})-O-$ を表わし、 $R^{\#}$ が水素原子またはホスフェート保護基を表わす場合、式Ⅸ

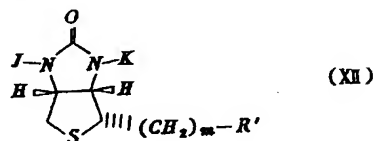
(7)

のであり、 L' は置換可能な基を表わす]の化合物またはそれらのイソ同族体を式Ⅹ

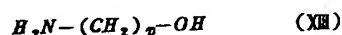


〔式中、 p は上記において定めたものであり、 Q は陰イオンである水酸基、チオール基または式 $N-R^*$ (R^* は上記において定めたものである)のアミン残基を表わす]の化合物と反応させ、これにより式Ⅶの化合物またはそれらのイソ同族体を形成させ、

(d) X が $-CONH-$ を表わす場合、一般式Ⅺ

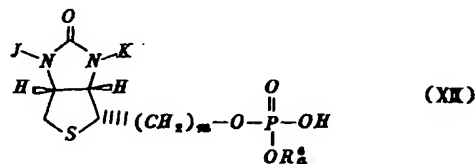


〔式中、 J 、 K および m は上記において定めたものであり、 R' はカルボン酸残基またはそれらの誘導体を表わす]の化合物またはそれらのイソ同族体を式Ⅻ

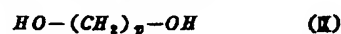


〔式中、 p は上記において定めたものである]の

(9)

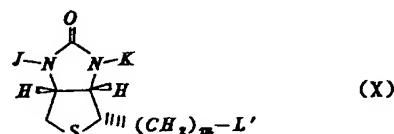


〔式中、 J 、 K 、 m および $R^{\#}$ は上記において定めたものである]のリン酸化ビオチノール誘導体またはそれらのイソ同族体を式Ⅻ



〔式中、 p は上記において定めたものである]の適当なジオールと反応させ、これにより式Ⅶの化合物またはそれらのイソ同族体を形成させ、

(e) X が $-S-$ 、 $-O-$ または $N-R^*$ を表わし、 R^* が直鎖または分枝鎖 C_{1-10} アルキル基を表わす場合、式Ⅹ

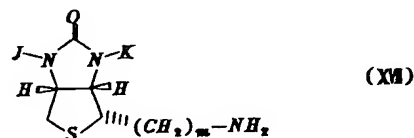


〔式中、 J 、 K および m は上記において定めたも

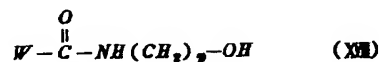
(8)

ビドロキシアルキルアミンと反応させ、これにより式Ⅶの化合物またはそれらのイソ同族体を形成させ、

(f) X が $-NHCONH-$ を表わす場合、一般式Ⅻ



〔式中、 J 、 K および m は上記において定めたものである]の化合物またはそれらのイソ同族体を一般式Ⅻ



〔式中、 p は上記において定めたものであり、 W は置換可能な基を表わす]の化合物と反応させ、これにより式Ⅶの化合物またはそれらのイソ同族体を形成させる

ことよる方法。

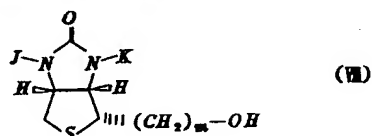
13. 前配式Ⅶ〔式中、 J 、 K 、 m 、 p および X は

(10)

請求項1ないし5のいずれかにおいて定めたものである]の化合物またはそれらのイソ同族体。

14. 前記式Ⅷ〔式中、 J 、 K 、 m 、 p および X は請求項1ないし5のいずれかにおいて定めたものであり、 R は対応するアルコール類に還元しうる基を表わし、ただし J および K はいずれも C_{1-} 、アルキル、 C_{1-} 、アルケニル、アセチル、メトキシカルボニル、フェニル、ベンジルまたはベンゾイルを表わさない]の化合物またはそれらのイソ同族体。

15. 前記式Ⅷ、式Ⅷ



または前記式Ⅸ〔これらの式中、 J 、 K 、 m 、 p 、 R および R' は請求項12において定めたものである]の化合物またはそれらのイソ同族体の製法であつて、対応する一般式ⅩⅣ、ⅩⅤまたはⅩⅥ

(11)

せることよりなる方法。

16. 請求項1ないし6、8、10、12および15のいずれかに記載の方法の2以上からなり、これらの方法が順次行われることよりなる方法。

3. [発明の詳細な説明]

(産業上の利用分野)

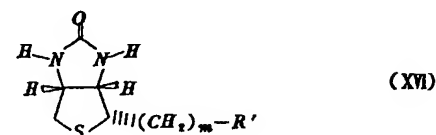
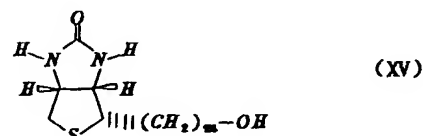
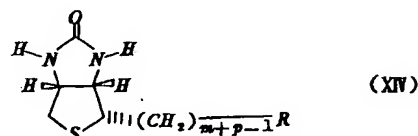
本発明はビオチニル化ポリヌクレオチドおよびそれらの同族体の製法、ならびにそれらの方法に用いる中間体に関する。

(従来の技術および課題)

標識ポリヌクレオチドプローブが広範な用途に用いられることは周知であり、たとえばルーウィン(Lewin)、*Science* 221:1167(1983)およびクラウスナー(Klausner)ら、*Bio/Technology*, 1:471(1983)に記載されている。標識オリゴヌクレオチドプローブは臨床用および研究用の診断手段として特に関心がもたれている。

通常の放射性標識プローブは有効であり、感受性も高いが、たとえば臨床検査室においてスクリ

(13)



〔式中、 J 、 K 、 m 、 p 、 R および R' は上記において定めたものである]の誘導体またはそれらのイソ同族体を式 J' の化合物および/または式 K' の化合物〔これらの化合物 J' および K' はそれぞれ上記において定めた基 J および K の前駆物質である〕と反応させ、これにより式Ⅷ、ⅨまたはⅩの化合物またはそれらのイソ同族体を形成さ

(12)

ーニング用としてルーテインに用いるのを制限する幾つかの問題を伴う。たとえば放射性標識プローブは潜在的に危険であり、廃棄の問題を生じる。さらに放射性標識プローブはしばしば不安定であり、標識として用いられる放射性物質—特に ^{32}P —の半減期が比較的に短いため保存寿命が限られる。さらにオートラジオグラフによる検出には時間がかかり、放射性標識プローブの取扱いには適切な安全性トレーニングを受けた者が必要である。

従つてプローブを標識するために非放射性方法を採用することが望まれており、ある種のこのような方法がたとえば以下の文献に記載されている。*D.C. ウォード(Ward)*、1981 *ICN-UCLA* シンポジウム、3月15~20日にコロラド州キーストーンにおいて開催、「精製遺伝子を用いる開発的生物学」、1981 XXIII、1981、647-658頁、アカデミック・プレス、編者ドナルド・D. ブラウン(Donald D. Brown)ら；およびA.D.B. マルコム(Malcolm)ら、第604回生化学会会合抄録、英国ケンブリッジ

(14)

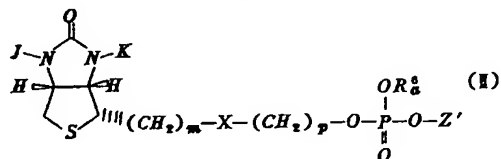
(1983年7月1日の会合)。ビオチンで標識されたプローブについても上記文献に広く記載されている。

ビオチンはオリゴヌクレオチドの標識に際して特に関心がもたれる。これはアビジンと強い相互作用を生じ、これによりたとえ酵素活性化された信号発生系または酵素標識をオリゴヌクレオチド型ハイブリダイゼーションプローブに好都合に結合させることができるからである。

ビオチン残基をホスフェート結合によりオリゴヌクレオチドに結合させる方法は既知であり、たとえば本出願人の欧州特許公開第202758号明細書に記載されている。この種の方法はホスホトリエステル化学によるものであり、これは特にたとえばDNA合成装置によるヌクレオチド配列の自動合成に採用されるホスホルアミダイト(phosphoramidite)化学と調和しない。さらにこれまでのところビオチンを保護された形でホスホルアミダイト化学によりヌクレオチド配列に結合させる好都合な方法は報告されていない。

(15)

チド鎖は支持体に結合していてもよい)の化合物またはそれらのイソ同族体の製法であつて、式II



[式中、 m 、 p 、 X 、 R_a および Z' は上記に定めたものであり、 J および K は同一でも異なつてもよく、それぞれ水素原子を表わすか、またはヌクレオチドリン酸化と適合性であり、化合物の親油性を高める保護基を表わし、 J および K のうち少なくとも一方は水素原子以外のものである]の化合物またはそれらのイソ同族体を脱保護し；これにより水素原子以外の J または K 基を除去して式Iaまたはそれらのイソ同族体を得ることよくなる方法が提供される。

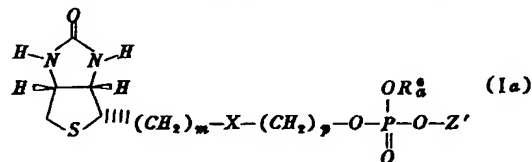
ここで用いる“イソ同族体(isoequivalent)”という語は一般に、その語が示す式の化合物と同じ機能を有し、水素原子以外の J または K 基の不

(17)

(発明の要約)

本発明は上記の難点を少なくとも一部は除く方法を見出したこと、およびそれに用いる中間体に関する。

従つて本発明の一観点によれば、式Ia



[式中、 m は4または5であり、 X は直接結合、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OR}_a)-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{CONH}-$ 、 $-\text{NHCONH}-$ または $\text{N}-\text{R}^b$ (R^b は直鎖または分枝鎖 C_{1-10} アルキル基を表わす)を表わし、 p は0~16の整数であり、ただし X が直接結合以外のものである場合、 p は少なくとも2の整数であり、 R_a は水素原子またはホスフェート保護基を表わし、 Z' は保護されていない形の、または塩基および/またはホスフェート部分が保護基を有する形のヌクレオチド配列を表わし、該ヌクレオ

(16)

在下でビオチン結合部、たとえばアビジン、ストレプトアビジンまたは抗ビオチン抗体との複合体を形成しうる化合物を意味する。従つて“イソ同族体”は一般にホスフェート基またはホスフィット基を介してヌクレオチド配列に結合するかまたは結合可能であり；かつ一般にヌクレオチドのリン酸化に適合し、この種の保護基が存在しない対応化合物よりもその化合物の親油性を高める保護基を少なくとも1種保有するか、または保有可能であろう。

脱保護を行う条件は保護基 J および/または K の性質に必然的に依存するであろう。たとえば酸不安定性の保護基は1種または2種以上の水性の酸、たとえば酢酸などの有機酸または塩酸などの鉱酸の存在下で除去しうる。一方、塩基不安定性の保護基は1種または2種以上の塩基、たとえば水酸化アンモニウムなどの水性塩基の存在下で除去しうる。

J および/または K が下記のもの表わす式IIの化合物を用いることが好ましい。テトラヒドロ

(18)

ピラニルたとえはテトラヒドロピラン-2-イル、6-メトキシ-テトラヒドロピラニルたとえは6-メトキシ-テトラヒドロピラン-2-イル、フリルたとえは2-フリル、ジメトキシトリチルたとえは4,4'-ジメトキシトリチル、キサンテニルたとえは9-フェニルキサンテニル、テトラヒドロチオピラニルたとえはテトラヒドロチオピラン-2-イル、4-メトキシテトラヒドロチオピラニルたとえは4-メトキシテトラヒドロチオピラン-2-イル、ベンゾイル、またはアシル基、たとえは6個まで(たとえは3~6個)の炭素原子を含むもの。好ましい保護基はテトラヒドロピラン-2-イル、6-メトキシ-テトラヒドロピラン-2-イル、またはジメトキシトリチル基である。JおよびKのうち少なくとも一方がジメトキシトリチルである式IIの化合物は、この基の除去に際して色が変化するので有利であろう。Jおよび/またはKがジメトキシトリチル基を表わす場合、これは水性の酸、たとえば水性トリフルオル酢酸もしくは水性酢酸、好ましくは水性酢酸、

(19)

基の双方として作用しうるであろう。この種の基にはたとえばメチル、2-シアノエチル、2-クロルフエニル、2,2,2-トリハロ-1,1-ジメチル-エチル、5-クロルキノリン-8-イル、2-メチルチオエチル基、または2-フェニルチオエチル基であり、ここでフェニル環はたとえばヘロゲン原子、たとえば塩素原子またはNO₂から選ばれる置換基を保有してもよい。一般にR⁸はメチルまたは2-シアノエチルを表わすであろう。

R⁸が水素原子である式IIの化合物を目的とする場合、それ自体既知の方法により、たとえば前記の式Iの化合物の製造に際し示した方法により、ホスフエート保護基を除去することができる。

式IIまたはIaの化合物中のZ'は保護されていないか、または保護された形である。Z'が意味するヌクレオチド配列の長さは、たとえばDNA合成装置において構成されうる配列の長さによつて制限されるにすぎないことは認識されるであろう。ヌクレオチド150個まで、たとえばヌクレ

(21)

または水性鉍酸、たとえば水性塩酸で処理することにより除去するのが好都合であろう。Jおよび/またはKがテトラヒドロピラニル基を表わす場合、これは水性の酸、たとえば水性鉍酸、たとえば水性塩酸で処理することにより除去するのが好都合であろう。

JおよびKのうち一方のみが保護基を表わし、他方は水素原子を表わすことが好都合である。

Xが先に定義された式N-R⁹の基以外のものである式IIの化合物を用いることが有利である。Xが-CONH-または-NHCONH-である場合、普通はmは4である。Xは好ましくは直接結合または基-O-P(O)(OR¹⁰)-O-である。従つてたとえばXが直接結合であり、mが5であり、pが0であるか、またはXが-O-P(O)(OR¹⁰)-O-であり、mが5であり、pが8である式IIの化合物が用いられる。

R¹⁰がホスフエート保護基(以下R⁹と呼ぶ)を表わす式IIの化合物を用いる場合、この基は一般にホスフエート保護基およびホスフイット保護

(20)

オチド100個までのポリヌクレオチド配列が製造されるであろう。一般にZ'はヌクレオチド単位6~30個、好都合にはヌクレオチド単位12~25個のオリゴヌクレオチド配列を表わす。オリゴヌクレオチド配列をたとえば遺伝的障害の検出に用いたい場合、オリゴヌクレオチド配列は好ましくはヌクレオチド単位17~20個である。従つて本発明はたとえば米国特許第4,683,195号および第4,683,202号明細書に記載されたPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法に用いられるオリゴヌクレオチド型プライマーの製造において関心がもたれる。

ヌクレオチド配列が保護された形である場合、各ヌクレオチド単位がヌクレオチド配列の糖-ホスフエート主鎖のホスフエート基に対するホスフエート保護基を保有するであろう。この種の保護基については文献中に十分に論じられている(N.D.シンハ(Sinha)ら、Nucleic Acids Research(1984)、12、p4539、J.L.フォーレイ(Fourley)およびJ.バレンネ

(22)

(Varene), *Tetrahedron Letters* (1984) 25, 4511-4514 または E. オーツカ (Ohtsuka) ら, *Nucleic Acids Research*, 1982, 10, 6553-6570)。さらに、適宜なホスフェート保護基はヌクレオチド化学者にとつて自明であり、たとえば先に R^6 に関連して記載したホスフェート保護基、たとえばメチルまたは 2-シアノエチルが含まれる。さらにこのヌクレオチド配列には通常のヌクレオシドである(デオキシ)シチジン、(デオキシ)アデノシン、(デオキシ)グアノシン、およびチミジンもしくは(デオキシ)ウリジンのうちいずれか一方、ならびに上記の通常のヌクレオシドのうち1種と塩基対合しうる塩基修飾ヌクレオシドが含まれていてもよい。この種の塩基修飾ヌクレオシドには(デオキシ)イノシンおよび(デオキシ)8-アザグアノシンが含まれる。適宜、ヌクレオチド配列中に存在するヌクレオチドの塩基部分が保護基を保有してもよい。従つてたとえばアデニン、シトシンおよびグアニン中のアミン置換基が適宜な

(23)

学者に自明である。

ホスフェート保護基がスルフィド結合を含む場合、この結合は除去される前に酸化して、対応するスルホキシドまたはスルホンにすることが好都合であろう。

前記の保護基 R^1 および R^2 について概説したように、脱保護を行う条件は必然的にホスフェート、ヌクレオチドのホスフェート、および塩基の各保護基の性質に依存するであろう。

たとえばホスフェート、および/またはヌクレオチドのホスフェートの保護基がメチル基である場合、これを求核試薬、たとえばフェノラートイオン、好ましくはチオフェノラートイオン、または塩基、たとえば水酸化アンモニウムで処理することによつて好都合に除去でき；上記の保護基が 2-シアノエチル基である場合、これは先に例示した塩基で処理することができる。

ヌクレオチド配列は所望により支持体、たとえば固体支持体、たとえば制御細孔ガラス製支持体に結合していてもよい。ヌクレオチド配列を支持

(25)

保護基を保有してもよく、この種の保護基については文献中に十分に論じられている(たとえば E. オーツカ (Ohtsuka) ら, *Nucleic Acids Research* (1982), 10, 6553-6570)。

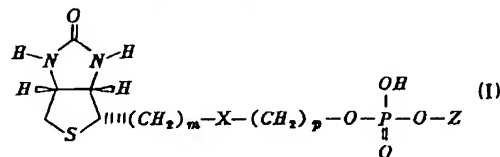
さらに、適宜な塩基保護基はヌクレオチド化学者に自明であり、特にイソブチリルおよびベンゾイルが含まれる。イソブチリル基はグアニンに対する保護基として特に好適であり、ベンゾイル基はシトシンおよびアデニンに対する保護基として特に好適である。従つて保護された塩基にはたとえば N^4 -ベンゾイルシトシン、 N^6 -ベンゾイルアデニンおよび N^2 -イソブチリルグアニンが含まれる。すべての塩基が保護を要するわけではなく、たとえばチミンおよびウラシルが保護基を必要としないことは認識されるであろう。

上記のホスフェート保護基、ヌクレオチドのホスフェート保護基、および塩基保護基はすべて文献中に十分に立証された方法に従つて除去することができる。この種の脱保護法はヌクレオチド化

(24)

体から開裂させる方法は文献中に十分に立証されており、また実際にヌクレオチド-支持体の開裂法はヌクレオチド化学者に自明である。上記の開裂および脱保護のために選ばれる条件は等しいか、または類似しており、従つてこれらの操作が同時に進行する可能性のあることは認められる。

式 II の化合物の脱保護によつて式 I



の化合物ではなく式 I a の化合物が生成した場合、所望により保護基をたとえばそれ自体既知の方法により除去し、および/または式 I a の化合物が支持体に結合している場合には所望によりこの化合物をたとえばそれ自体既知の方法により支持体から開裂させることができ、これによつて式 I の化合物が得られる。

式 II または I a の化合物の保護基の除去、および

(26)

び支持体からの開裂はいかなる好都合な順序で行うこともでき、これは個々の場合に選ばれる個々の条件に依存するであろうということは認識されるであろう。

従つてたとえば(a)支持体に結合した完全に保護された化合物を、ホスフェート保護基を除去しかつヌクレオチド配列を支持体から開裂させる反応により処理し、こうして得られた化合物を次いで塩基保護基が除去される脱保護工程によりさらに処理し、こうして得られた化合物を最後に保護基Jおよび/またはKが除去される脱保護工程により処理すると、式Iの化合物が得られる。

あるいは(b)支持体に結合した完全に保護された式IIの化合物を保護基Jおよび/またはKが除去される脱保護工程により処理し、こうして得られた化合物を次いでホスフェート保護基を除去しかつヌクレオチド配列を支持体から開裂させる反応により処理し、こうして得られた化合物を最後に塩基保護基が除去される脱保護工程によりさらに処理すると、式Iの化合物が生成する。

(27)

Kが除去される脱保護工程により処理し、こうして得られた化合物を次いでさらにホスフェート保護基が除去される脱保護工程により処理し、こうして得られた化合物を次いでヌクレオチド配列が支持体から開裂する開裂反応により処理し、得られた化合物を最後に塩基保護基が除去される脱保護工程により処理すると、式Iの化合物が得られる。

あるいはたとえば(c)支持体に結合した完全に保護された式IIの化合物をホスフェート基が除去される脱保護工程により処理し、こうして得られた化合物を次いで塩基保護基を除去しかつヌクレオチド配列をその支持体から開裂させる反応により処理し、こうして得られた化合物を最後に保護基Jおよび/またはKが除去される脱保護工程により処理すると、式Iの化合物が得られる。

あるいはたとえば(d)支持体に結合した完全に保護された式IIの化合物を保護基Jおよび/またはKが除去される脱保護工程により処理し、こうして得られた化合物をヌクレオチド配列を支持体か

(29)

あるいはたとえば(e)支持体に結合した完全に保護された式IIの化合物をホスフェート保護基が除去される脱保護工程により処理し、こうして得られた化合物を次いでヌクレオチドがその支持体から開裂する開裂反応により処理し、こうして得られた化合物を次いで塩基保護基が除去される脱保護工程により処理し、こうして得られた化合物を最後に保護基Jおよび/またはKが除去される脱保護工程により処理すると、式Iの化合物が得られる。

あるいは(f)支持体に結合した完全に保護された式IIの化合物を、ホスフェート保護基を除去しかつヌクレオチド配列を支持体から開裂させる反応により処理し、こうして得られた化合物を次いで保護基Jおよび/またはKが除去される脱保護工程により処理し、こうして得られた化合物を最後に塩基保護基が除去される脱保護工程により処理すると、式Iの化合物が得られる。

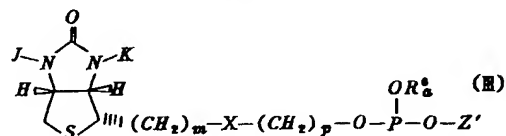
あるいはたとえば(g)支持体に結合した完全に保護された式IIの化合物を保護基Jおよび/または

(28)

ら開裂させかつホスフェート保護基および塩基保護基を除去する反応により処理する。

式IIまたはIの化合物の保護基を除去し、これらを支持体から開裂させるための順序は特に上記に概説した順序(a)である。

本発明の他の別個の独立した観点によれば、前記式IIの化合物またはそれらのイソ同族体の製法であつて、対応する式III



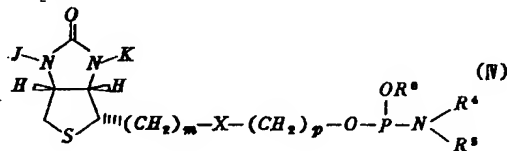
〔式中、m、p、J、K、Z'、XおよびR₆は上記において定めたものである〕の化合物またはそれらのイソ同族体を酸化することとなる。

上記の酸化反応に用いられるホスフィン酸酸化剤は当業者に知られており、漂白剤；過酸たとえば過安息香酸、次亜塩素酸塩たとえば次亜塩素酸ナトリウム、過マンガン酸塩たとえば過マンガン酸カリウム；過酸化物、たとえばビス(トリメチ

(30)

ルシリル)ペルオキシド;またはヨウ素、好ましくは水性ヨウ素から選ぶことが好都合である。

本発明の他の別個の独立した観点によれば、前記式Ⅲ〔上記において定めたとおり〕の化合物またはそれらのイソ同族体の製法であつて、式Ⅳ

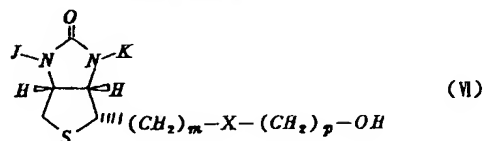


(式中、J、K、m、pおよびXは上記において定めたものであり、R⁴およびR⁵は同一でも異なることもよく、それぞれC₁₋₁₀の直鎖もしくは分枝鎖アルキル基、好ましくはメチルもしくはイソプロピルであるか、またはR⁴とR⁵はそれらの間にある窒素原子と共に、異種原子1、2、3または4個を含む5〜7員複素環を表わし、窒素原子のほか存在する異種原子は酸素、窒素およびイオウから選ばれ、R⁵は上記において定めたR⁴に対応するが、ただし水素原子以外のものである)

(31)

列を支持体に結合させるために、およびこれを支持体から離脱させるために、また前記の結合反応のために適切な条件を選ぶことができるであろう。式Ⅳの化合物を結合させるのに好都合な位置はオリゴヌクレオチド配列の5'末端である。ヌクレオチド配列を結合反応の前に支持体に結合させることが好都合である。この結合反応は有利にはヌクレオチドの自動合成用装置、たとえばDNA合成装置により行われる。結合反応はたとえば1回または2回反復することができる。結合反応は所望により1種または2種以上の有機溶剤、たとえばジクロルエタンもしくはアセトニトリルまたはそれらの混合物の存在下で行うことができる。

本発明の他の独立した観点によれば、前記式Ⅳ〔上記において定めたとおり〕の化合物またはそれらのイソ同族体の製法であつて、式Ⅴ



(33)

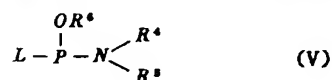
の化合物またはそれらのイソ同族体を、上記において定めた基Z'のヌクレオチド配列に対応するが、ただし式Ⅳの化合物への付着位置においては保護されておらず、このためこの位置での結合が可能である式Z'のヌクレオチド配列と結合させ、これにより式Ⅲの化合物またはそれらのイソ同族体を得ることよりなる方法が提供される。R⁵が水素原子である式Ⅲの化合物を目的とする場合、ホスフェート保護基をそれ自体既知の方法により除去することができる。

R⁴およびR⁵がそれらの間にある窒素原子と共に複素環を表わす式Ⅳの化合物を用いる場合、環は飽和されているか、またはより好ましくないが不飽和であつてもよく、5個または6個の環員子、たとえば6個の環員子を有することが好都合である。複素環は2個を上回る異種原子を含まないことが好都合であり、この種の環はたとえばピペリジノおよびモルホリノ基、好ましくはモルホリノ基、たとえば4-モルホリノ基である。

熟練したヌクレオチド化学者はヌクレオチド配

(32)

〔式中、J、K、m、pおよびXは上記において定めたものである、ただしR⁵は水素を要さない〕の化合物またはそれらのイソ同族体を式Ⅵ

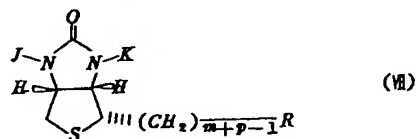


〔式中、R⁴、R⁵およびR⁶は上記において定めたものであり、Lは置換可能な基である〕の化合物と反応させ、これにより式Ⅳの化合物またはそれらのイソ同族体を形成させることよりなる方法が提供される。

Lがハロゲン原子、特に塩素原子または臭素原子、殊に塩素原子である式Ⅵの化合物を用いるのが好都合である。適切な反応条件は当業者に明らかであろう。反応は1種または2種以上の溶剤、たとえば非プロトン溶剤、たとえばエーテル、またはハロアルカン、たとえば塩化メチレンもしくは四塩化炭素、より有利にはジハロメタン系溶剤、たとえばジクロルメタンの存在下で行うことが好都合である。

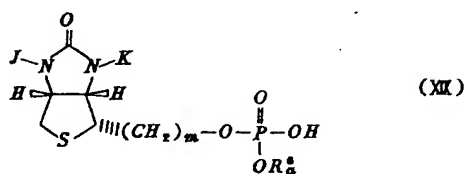
(34)

本発明の他の別個の独立した観点によれば、一般式Ⅶ〔式中、Xは直接結合を表わし、J、K、mおよびpは上記において定めたものである〕の化合物またはそれらのイソ同族体であつて、対応する一般式Ⅷ

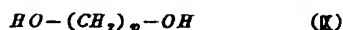


〔式中、J、K、mおよびpは上記において定めたものであり、Rは対応するアルコール類に還元しうる基を表わす〕の化合物またはそれらのイソ同族体を還元し、これにより式Ⅶの化合物またはそれらのイソ同族体を生成させることよりなる方法が提供される。この還元は還元剤の存在下で好都合に行われる。適切な還元剤は当業者に自明であり、たとえば複合金属ハロゲン化物、たとえば水素化アルミニウムリチウム；またはジボラン、好都合には水素化アルミニウムリチウムが含まれる(H. C. ブラウン(Brown)およびS. クリシュ

(35)

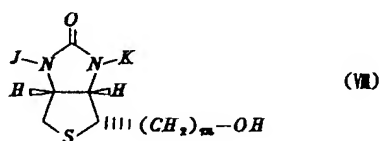


〔式中、J、K、mおよびRは上記において定めたものである〕のリン酸化(phosphorylated)ピオチノール誘導体またはそれらのイソ同族体を、一般式Ⅹ



〔式中、pは上記において定めたものである〕の適宜なジオールと反応させ、これにより先に定めた式Ⅶの化合物またはそれらのイソ同族体を生成させることよりなる方法が提供される。

式Ⅸの化合物またはそのイソ同族体は一般式Ⅺ



(37)

ナムルフィー(Krishnamurphy)、Tetrahedron (1979)、35、p 567-607)。この還元は所望により1種または2種以上の溶剤、たとえば有機溶剤、たとえば非プロトン溶剤、特にテトラヒドロフラン(THF)の存在下で行われる。Rが特にカルボン酸無水物、イミダゾリドまたはそれらのエステル、たとえば脂肪族エステル、特にアルキルエステル、たとえばC₁₋₆アルキルエステル、たとえばメチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチルおよびヘキシルエステル、好ましくはメチルエステルの残基である式Ⅶの化合物を用いるのが好都合である。

本発明の他の別個の独立した観点によれば、一般式Ⅶ〔式中、Xは-O-P(O)(OR₂)-O-を表わし、J、K、mおよびpおよびR₂は上記において定めたものである〕の化合物またはそれらのイソ同族体の製法であつて、一般式Ⅻ

(36)

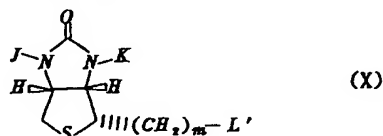
〔式中、J、Kおよびmは上記において定めたものである〕の化合物またはそのイソ同族体をリン酸化剤(phosphorylating agent)と反応させることによつて得られる。好都合なリン酸化剤の選択により、R₂がホスフェート保護基R^{*}

(先に定めたものである)を表わす式Ⅻの化合物を製造しうることは認識されるであろう。好都合なリン酸化剤は当業者に自明であり、これには塩化ホスホリル、および(置換)アリールホスホロジ(1, 2, 4-トリアゾリド)、たとえば1, 2, 4-トリアゾールおよび2-クロルフエニルホスホロジクロリデートを塩基、たとえばピリジンの存在下で反応させることにより生成する2-クロルフエニルホスホロジ(1, 2, 4-トリアゾリド)が含まれる。リン酸化(phosphorylation)は1種または2種以上の有機溶剤の混合物、たとえば非プロトン溶剤、たとえばピリジンなどの存在下で行うことができる。R₂が水素原子を表わす式Ⅶの化合物を、それ自体既知の方法により選択的に保護して、R₂が先に定めた

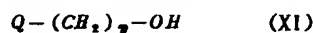
(38)

ホスフェート保護基 R^* を表わす対応する化合物を得ることができる。

本発明の他の別個の独立した観点によれば、一般式 VI [式中、 X は $-S-$ 、 $-O-$ または $N-R^*$ を表わし、 J 、 K 、 m 、 R^* および p は上記において定めたものである] またはそれらのイソ同族体の製法であつて、一般式 X

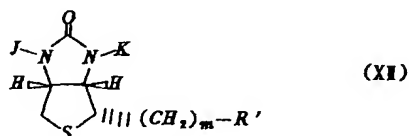


[式中、 J 、 K および m は上記において定めたものであり、 L' は置換可能な基を表わす] またはそれらのイソ同族体を一般式 XI

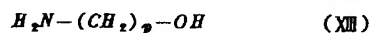


[式中、 p は上記において定めたものであり、 Q は陰イオンである水酸基、チオール基、または式 $N-R^*$ (R^* は上記において定めたものである) のアミン残基を表わす] と反応させ、これにより先に定めた式 VI の化合物またはそれらのイソ同族

(39)



[式中、 J 、 K および m は先に定めたものであり、 R' はカルボン酸残基またはその誘導体を表わす] の化合物またはそれらのイソ同族体を式 XIII



[式中、 p は上記において定めたものである] のヒドロキシアシルアミンと反応させ、これにより先に定めた式 VI の化合物またはそれらのイソ同族体を生成させることよりなる方法が提供される。好都合なカルボン酸誘導体にはエステル、たとえば脂肪族エステル、たとえば C_1-C_6 アルキルエステル; 無水物および酸塩化物が含まれる。好都合な反応条件は当業者に自明であろう。

本発明の他の別個の独立した観点によれば、一般式 VII [式中、 J 、 K 、 m および p は先に定めたものであり、 X は $-NHCONH-$ を表わす] または

(41)

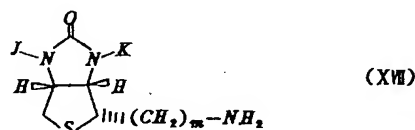
体を生成させることよりなる。

式 L' の好都合な置換可能な基は当業者に自明であり、これにはハロゲン原子、たとえば塩素原子または臭素原子、メシレートおよびトシレート残基、好都合にはトシレート残基が含まれる。この反応は 1 種または 2 種以上の有機溶剤の混合物たとえば非プロトン溶剤、たとえばジメチルホルムアミド (DMF) などの存在下で行うことができる。一般式 X の化合物は対応する式 VII のピオチニル誘導体からそれ自体既知の方法により製造することができる。たとえば置換可能な基 L' としてトシレート基を有する式 X の化合物を目的とする場合、これは対応する式 VII の化合物をハロゲン化トシル、たとえば塩化トシルと反応させることによつて製造するのが好都合である。

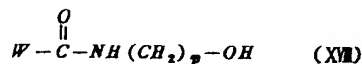
本発明の他の別個の独立した観点によれば、一般式 VI [式中、 J 、 K 、 m および p は先に定めたものであり、 X は $-CONH-$ を表わす] の化合物またはそれらのイソ同族体の製法であつて、一般式 XII

(40)

それらのイソ同族体であつて、一般式 XVII



[式中、 J 、 K および m は上記において定めたものである] の化合物またはそれらのイソ同族体を一般式 XVIII



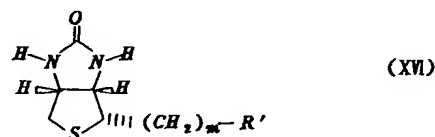
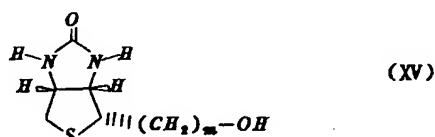
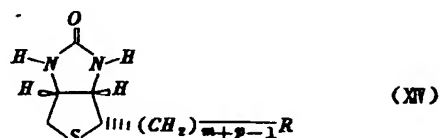
[式中、 p は上記において定めたものであり、 W は置換可能な基を表わす] の化合物と反応させ、これにより式 VI の化合物またはそれらの同族体を生成させることよりなる。好都合な置換可能な基は当業者に自明であり、これにはアリールオキシ基、たとえばフェニルオキシ基が含まれる。

一般式 XVII の化合物は前記式 XII の化合物からそれ自体既知の方法により、たとえばクルチウス転位に基づく方法により得られる。一般式 XVIII の化合物は対応する式 XII (p は先に定めたものであ

(42)

る)のアミンからそれ自体既知の方法により得られる。

本発明の他の別個の独立した観点によれば、前記式Ⅵ、ⅦまたはⅧ〔これらの式中、 J 、 K 、 m 、 p 、 R および R' は上記において定めたものである〕の化合物またはそれらのイソ同族体の製法であつて、対応する一般式Ⅳ、ⅤまたはⅥ



(43)

の好都合な前駆物質はそれぞれ2,3-ジヒドロピランおよび2-メトキシ-2,3-ジヒドロピランである。選ばれた基 J および/または K がジメトキシトリチル基である場合、その好都合な前駆物質はジメトキシトリチルクロリドまたはジメトキシトリチルブロミドである。

一般式Ⅵの化合物は当技術分野で知られている——たとえば欧州特許出願第86302750.4号(公開第202758号)明細書を参照されたい——か、またはそれ自体既知の方法によりピオチン誘導体から製造できる。

前記一般式Ⅳ、ⅤおよびⅥの化合物は新規であり、これら一般式のものそれぞれ本発明のさらに別個の観点をなす。式Ⅶの化合物も新規であり、本発明の他の特徴をなすと考えられる。この種の式Ⅶの化合物には J または K のいずれも C_{1-3} アルキル、 C_{1-3} アルケニル、アセチル、メトキシ

(45)

〔式中、 J 、 K 、 m 、 p 、 R および R' は上記において定めたものである〕の誘導体またはそれらのイソ同族体を式 J' の化合物および/または式 K' の化合物〔これらの化合物 J' および K' はそれぞれ上記において定めた基 J および K の前駆物質である〕と反応させ、これにより式Ⅵ、ⅦまたはⅧの化合物またはそれらのイソ同族体を形成させることよりなる方法が提供される。好都合な反応条件は当業者に自明であろう。ここで“前駆物質(precursors)”という語は、それらと前記式Ⅵの化合物の反応によつて目的とする基 J および/または K が導入されて、対応する式Ⅵの化合物が得られるべく選ばれた化合物を示すために用いられる。たとえば特に、選ばれた基 J および/または K がテトラヒドロピラン残基、たとえばテトラヒドロピラン-2-イルまたは6-メトキシテトラヒドロピラン-2-イルである場合、それら

(44)

カルボニル、フェニル、ベンジルまたはベンゾイルを表わさない化合物が含まれるであろう。

J または K のいずれも C_{1-3} アルキル、 C_{1-3} アルケニル、アセチル、メトキシカルボニル、フェニル、ベンジルまたはベンゾイルを表わさない式Ⅵの化合物は本発明の他の特徴をなす。

格別な化合物群には、 X が直接結合であるか、 m が5であるか、または p が0であるか、または X が $-O-P(O)(OH)-O-$ であるか、または p が8である前記各式のものが含まれる。より格別な化合物群には、 X が直接結合であり、 m が5であり、かつ p が0であるか、または X が $-O-P(O)(OH)-O-$ であり、かつ p が8である前記各式の化合物が含まれる。

本発明は前記方法2種以上が順次配列したものからなる方法にも関する。好都合には上記方法のうち1種または2種以上がDNA合成装置において行われ、従つて本発明の他の特徴によれば、前記方法のうち少なくとも1種を行うべくプログラ

(46)

ムされたDNA合成装置が提供される。塩基保護基の除去法を除いて、式I、Ia、IIおよび/またはIIIの化合物の製法はDNA合成装置に用いるのに特に好適である。

本発明により製造されるビオチニル化オリゴヌクレオチド配列は、たとえばハイブリダイゼーションアッセイ法において相補的配列を検出するためのプローブとして、当技術分野において知られている方法により製造された誘導体と同様な様式で、好都合に使用できる。本発明により製造できる好都合なプローブは欧州特許出願公開第202,758号明細書に示されている。

本発明は以下の実施例により説明されるが、これらによつて限定されない。各例においてオリゴヌクレオチド配列インターフェロン α_2 -55は下記のものである。

AAGAAATACAGCCCC

各例においてかつこ内に示された文字A~Mは実施例の末尾の一覧表中の構造式を表わす。

(47)

ン

NBT-ニトロブルー-テトラゾレウム

BCIP-5-ブロム-4-クロル-3-インドリルホスファート

以下のものは商標である。

フラクトシル(Practosil)、パーティシル(Partisol) 10-SAX、ファイコール(Ficol) 400,000、トライトン(Triton)-X-100、コア・バッファ- (Core Buffer)、ノニデット(Nonidet) P40、ツイーン(Tween)、C18- μ ボンダパック(Bondapak)

実施例 1.

ビオチニルヒドロキシ[5'-(インターフェロン α_2 -55)]ホスフィンオキシド(A)

塩酸(0.1N、600 μ L)を下記により得たヒドロキシ[5'-(インターフェロン α_2 -55)]-N'- (テトラヒドロ-2-ピラニル)ビオチニルホスフィンオキシド(B)0.1 μ モルに添加し、混合物を22℃に45分間放置した。水酸化アンモニウム(比重0.91、126 μ L)を添加し、次

(49)

各例における各種試薬の成分は下記のとおりである。

PBS-150 mM NaCl+10 mM リン酸ナトリウム(pH 7.4)

SSC-0.15 M NaCl+0.015 M クエン酸ナトリウム

デンハルト(Denhardt)試薬 0.02% BSA

0.02% ファイコール
400,000

0.02% PVP

下記の略号を用いた。

DMF-ジメチルホルムアミド

DNA-デオキシリボ核酸

PBS-リン酸緩衝食塩液

SDS-ドデシル硫酸ナトリウム

BSA-ウシ血清アルブミン

PVP-ポリビニルピロリデン

HEPES-(N-2-ヒドロキシエチル-N'-2-エタンスルホン酸)

TRIS-トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタ
(48)

いでビオチニル化オリゴヌクレオチド誘導体(A)を二段階高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)法により精製した(C.R.ニュートン(Newton)ら、Anal.Biochem. 1983, 129, p 22-30に記載)。

1回目のパーティシル10-SAX イオン交換樹脂上におけるHPLC(緩衝液系を用)により、保持時間29.8分の最も長時間保持されたピークとしてビオチニル化オリゴヌクレオチド(A)を得た。等しい条件下で分析した場合、ビオチニル化オリゴヌクレオチド誘導体(B)は28.9分の保持時間を有し、母体オリゴヌクレオチド配列であるインターフェロン α_2 -55(C)は28.6分の保持時間を有していた。

2回目の μ -ボンダパックC-18(10-45%, 約10 μ m(40'))においては20.0分の保持時間をもつ(A)を与え、(B)および(C)は等しい条件下で分析した場合それぞれ24.0分および18分の保持時間を有していた。

出発物質として用いた保護されたビオチニル化

(50)

オリゴヌクレオチド(B)は以下により製造された。

a) N^1 -(テトラヒドロピラン-2-イル)ピオチンメチルエステル

トルエン-4-スルホン酸・1水化物(11.4g)を新たに蒸留された2,3-ジヒドロ-4H-ピラシ(10.2g)およびD(+)-ピオチンメチルエステル(3g)[E.A. バイエル(Bayer)およびM.ウィルチエック(Wilchke), *Methods of Biochemical Analysis*, 26, p.1]のジクロルメタン(40ml)中の溶液に0℃で撹拌下に添加した。混合物をこの温度で10分間、次いで22℃で1.5時間撹拌した。この溶液を順次、水(50ml)、飽和炭酸水素ナトリウム溶液(50ml)および飽和ブライン溶液(50ml)で洗浄し、次いで無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、蒸発させた。残渣を最小量のジエチルエーテルに入れ、石油エーテル(沸点40~60℃)で摩砕処理して、 N^1 -(テトラヒドロピラニル)ピオチンメチルエステル1.8gを得た。融点120~122℃、収率45%。

(51)

ウムを分解した。ブタン-1-オール(150ml)を添加したのち、混合物がわずかに酸性(pH 5.0)になるまで1N塩酸を添加した。水層を廃棄し、ブタノール溶液を飽和炭酸水素ナトリウム溶液(150ml)で2回、次いで飽和ブライン溶液(150ml)で2回洗浄した。水(150ml)をブタノール溶液に添加し、混合物を減圧下に40℃で蒸発させた。残渣をシリカゲル(50g; メルク Ar 1.9385)のカラムにより、 CH_2Cl_2 : CH_3OH , 9:1(v/v)を溶離剤として用いて分画した。適宜な画分(シリカゲル上での薄層クロマトグラフィーによる指示に従う)を合わせたものから溶剤を蒸発させたのち、 N^1 -(テトラヒドロピラン-2-イル)ピオチノール(0.33g、収率70%)が油として得られた。質量イオン(M^+ =314)。

c) メトキシモルホリノ [N^1 -(テトラヒドロピラン-2-イル)ピオチノリル]ホスフィン(D)

クロル(メトキシ)モルホリノホスフィン

(53)

質量イオン(M^+ =342)、NMR $\delta((CD_3)_2S=O)$:
 プルーカ-WH 400MHz 6.85(1H, s, H-3);
 4.80(1H, dxd, H-1'); 4.48(1H, m, H-6a); 4.10(1H, m, H-3a); 3.87(1H, dxd, H-5'); 3.40(1H, dxd, H-5'); 3.61(3H, s, OCH_3); 3.15(1H, m, H-4); 3.10(1H, d, H-6); 2.83(1H, dxd, H-6); 2.33(2H, t, 2x H-10); 1.9-1.3(12H, 複合m, 2x H-7, 2x H-8, 2x H-9; 2x H-2'; 2x H-3', 2x H-4')。

b) N^1 -(テトラヒドロピラン-2-イル)ピオチノール

N^1 -(テトラヒドロピラン-2-イル)ピオチンメチルエステル(0.5g)の蒸留テトラヒドロフラン(25ml)中の溶液を水素化アルミニウムリチウム(0.27g)のテトラヒドロフラン(25ml)中の懸濁液に0℃で窒素雰囲気下に滴加した。撹拌を30分間続け、次いで水:テトラヒドロフラン混合物1:19 v/v(20ml)を慎重に添加することにより、過剰の水素化アルミニウムリチ

(52)

(0.13g)を5分間にわたって N^1 -(テトラヒドロピラン-2-イル)ピオチノール(0.2g)およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.35g)の乾燥ジクロルメタン(5ml)中の溶液に0℃で撹拌しながら窒素雰囲気下に添加した。反応混合物の温度を1時間にわたって22℃に高め、次いで混合物を蒸発させた。残留する油をジクロルメタンに溶解し、シリカゲル(50g; メルク Ar 1.9385)のカラムによりトリエチルアミン:酢酸エチル(7:3 v/v)を溶離剤として用いて分画した。適宜な画分を合わせたものから溶剤を蒸発させて、メトキシモルホリノ [N^1 -(テトラヒドロピラン-2-イル)ピオチノリル]ホスフィン(D)(50mg、収率17%)を得た。質量イオン($M+H$) $^+$ =462。

d) ヒドロキシ[5'-(インターフェロン- α_2 -55)] N^1 -(テトラヒドロピラン-2-イル)ピオチノリルホスフィンオキsid(B)
 インターフェロン- α_2 遺伝子合成において配列55として知られている完全に保護されたオリゴ

(54)

デオキシリボヌクレオチド配列(C)〔M.D. エッジ(Edge)ら、*Nucleic Acids Res.*, 1983, 11, 6419-6435に記載〕-制御細孔ガラス製支持体に結合-をアブライド・バイオシステムズ380A・DNA合成装置により、下記のものから製造した。5'-ジメトキシトリチル-N²-イソブチリル-2'-デオキシグアノシン0.2μモル-制御細孔ガラス(細孔寸法500Å;粒径125~174ミクロン)に結合;装填量20~50μモル/g、BDH社)、ならびに5'-ジメトキシトリチル-N⁸-ベンゾイル-2'-デオキシアデノシン、5'-ジメトキシトリチル-N⁶-ベンゾイル-2'-デオキシシチジン、5'-ジメトキシトリチル-N²-イソブチリル-2'-デオキシグアノシンおよび5'-ジメトキシトリチルチミジンの2-シアノエチル-N, N-ジイソプロピルアミノホスホルアミダイト(BDHケミカルズ社)。

〔あるいは完全に保護されたオリゴデオキシリボヌクレオチド配列はアトキンソン(Atkinson)およびスミス(Smith)が“オリゴヌクレオチド

(55)

トキシトリチル基を除去した。

(2) 上記ホスフィン(D)を上記(1)のオリゴヌクレオチド配列に20秒間および5秒間の2回、結合させた。次いで、こうして得た完全に保護された〔5'-(インターフェロン-α₂-55)〕メトキシ-N¹-(テトラヒドロピラン-2-イル)ピオチノリルホスフィン(E)をヨウ素酸化して、対応するホスフェート(F)を得た。次いでこのホスフェート誘導体を部分的に脱保護してすべてのホスフェート保護基を除去し、オリゴヌクレオチド配列を制御細孔ガラス製支持体から開裂させた。両操作とも適宜な量のチオフェノラートイオン、次いで水酸化アンモニウム(比重0.91)を用いてDNA合成装置により自動的に行われた。得られた水酸化アンモニウム溶液を次いで55℃に6時間加熱し、次いで蒸発させ、ヒドロキシ〔5'-(インターフェロン-α₂-55)-N¹-(テトラヒドロピラン-2-イル)ピオチノリルホスフィンオキシド(B)〕を含有する残渣をエタノール/水(3:7 v/v, 1.5 ml)に溶解した。次いでこの溶液を

(57)

の合成、実用的方法”(編者、M.J. ゲイト(Gait)、IRL プレス、ワシントンDC. オックスフォード、p.35-81)に記載した手動による方法で製造することができる。)メトキシモルホリノ〔N¹-(テトラヒドロピラン-2-イル)ピオチノリル〕ホスフィン(D)12.6mgの1, 2-ジクロルエタン:アセトニトリル(2:3 v/v)0.6 ml中の溶液をアブライド・バイオシステムズ380A DNA合成装置による改良された結合反応における通常のヌクレオチドホスホルアミダイトの代わりに使用し、完全に保護されたオリゴデオキシリボヌクレオチド配列インターフェロン-α₂-55(C)の5'末端に付加させて、オリゴデオキシリボヌクレオチド配列が前記のように完全に保護された〔5'-(インターフェロン-α₂-55)〕メトキシ-N¹-(テトラヒドロピラン-2-イル)ピオチノリルホスフィン(E)を得た。この改良された結合反応は以下の工程からなっていた。

(1) 完全に保護された配列から1, 2-ジクロルメタン中の3多トリクロル酢酸を用いて5'-ジメ

(56)

そのまま後続の脱保護工程に用いた。

実施例 2.

ピオチノリルヒドロキシ〔5'-(インターフェロン-α₂-55)〕ホスフィンオキシド(A)

下記により得られるN¹-(4, 4'-ジメトキシトリチル)ピオチノリルヒドロキシ〔5'-(インターフェロン-α₂-55)〕ホスフィンオキシド(G)0.1μモルを、ピリジン4滴を含有する80%酢酸2 mlにより室温で20分間処理した。酢酸を減圧下での蒸発、ならびに水(2 ml)およびn-ブタノール(0.5 ml)との共沸により除去した。表題のオリゴヌクレオチド(A)を1.5 mlの15%エタノール、H₂Oに入れ、実施例1に示した二段階高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)により精製した。

1回目のパーティシール10-SAX上におけるHPLC(60%ホルムアミド、0-100%、~~1-27cm~~50'において、直線濃度勾配)により、母体オリゴヌクレオチド(C)の16分間と比較して最も長時間保持された、保持時間17分のピー

(58)

クとして表題のビオチニル化オリゴヌクレオチド (A)を得た。2回目の μ -ボンダパックC-18上でのHPLCは、それぞれ保持時間31.0および28.8分を与えた。 μ -ボンダパック(10-100 μ 、~~約10-20 μ~~ (40'))において)を用いて反復した場合、それぞれ29.3および14.4分が記録された。

出発物質として用いた保護されたビオチニル化オリゴヌクレオチド(G)は下記により製造された。

a) N^1 -(4, 4'-ジメトキシトリチル)ビオチンメチルエステル

無水D(+)ビオチンメチルエステル(5.0g; 無水ピリジンとの共沸蒸留により乾燥)および4, 4'-ジメトキシトリチルクロリド(7.25g)の無水ピリジン(125ml)中の溶液を22℃で1時間攪拌した。メタノール(20ml)を添加し、混合物を蒸発させた。残渣を塩化メチレン(300ml)に溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム溶液(2 \times 200ml)および飽和ブライン溶液(2 \times 200ml)で順次洗浄し、次いで無水硫酸マグネシウム(59)

g)。

b) N^1 -(4, 4'-ジメトキシトリチル)ビオチノール

N^1 -(4, 4'-ジメトキシトリチル)ビオチンメチルエステル4.0gの乾燥蒸留テトラヒドロフラン(300ml)中の溶液をテトラヒドロフラン(130ml)中の水素化アルミニウムリチウム(1.3g)の懸濁液に22℃で滴加した。攪拌を20分間続け、次いで水:テトラヒドロフラン混合物(1.19v/v; 100ml)を慎重に添加することにより、過剰の水素化アルミニウムリチウムを分解した。ブタン-1-オール(500ml)を添加し、混合物を飽和硫酸ナトリウム溶液(100ml)および水(100ml)で順次洗浄し、次いで減圧下に40℃で蒸発させた。残留する褐色の油を塩化メチレン(80ml)に溶解し、ウォーターズ・ブレブ500HPLC 1カートリッジシステムにより、メタノール:塩化メチレン(1.9v/v)を溶離剤として用いて分画した。適宜な画分(150ml; 5~8)を蒸発させたのち、 N^1 -(

(61)

で乾燥させ、蒸発させた。残留する油を塩化メチレン(80ml)に溶解し、ウォーターズ・ブレブ500HPLC 2カートリッジシステム(ウォーターズ・アソシエーツ社)により、塩化メチレン(8L)中の0-8%メタノールの濃度勾配を用いて精製した。適宜な画分(300ml; 14~16)を蒸発させたのち、 N^1 -(4, 4'-ジメトキシトリチル)ビオチンメチルエステルを黄金色の固体として得た。

質量イオン(M^+ =560, NMR δ (CDCl₃, 200 MHz) 7.22(9H, m, 芳香族プロトン); 6.83(4H, d, 芳香族プロトン); 4.94(1H, 幅広い s, NH); 4.35(2H, m, H_{3a}, H_{6a}); 3.78(3H, s, メトキシプロトン); 3.68(3H, s, メチルエステルプロトン); 3.11(1H, m, H₄); 2.47(1H, dx d, J_{gem}=13 Hz, J_{10,9a}=1.7 Hz, H₉); 2.29(2H, t, J_{9,10}=6.7 Hz, 2x H₁₀); 2.27(1H, dx d, J_{gem}=13 Hz, J_{6,5a}=5.3 Hz, H₅); 1.5(6H, 複合 m, 2x H₈, 2x H₇, 2x H₉)。 (4.4g; 収率40 (60)

(4, 4'-ジメトキシトリチル)ビオチノールを褐色の油として得た。

質量イオン(M^+ =532)、(3.02g; 収率80%)。

c) [N^1 -(4, 4'-ジメトキシトリチル)ビオチノール]メトキシモルホリノホスフィン(H)

実施例1、c)部において採用したと同様な方法で、ただし N^1 -(4, 4'-ジメトキシトリチル)ビオチノールを N^1 -(テトラヒドロピラン-2-イル)ビオチノールの代わりに用いて、[N^1 -(4, 4'-ジメトキシトリチル)ビオチノール]メトキシモルホリノホスフィン(H)を無色の油として44%の収率で得た。NMR データは以下のとおりであつた。(CDCl₃, 200 MHz) 7.22(9H, m, 芳香族プロトン); 6.80(4H, d, 芳香族プロトン); 4.92(1H, s, NH); 4.33(2H, m, H_{3a}, H_{6a}); 3.8(3H, s, メトキシプロトン); 3.68(1H, m, H₄); 3.6(2H, t, J_{10,11}=4.2 Hz, 2x H₁₁); 3.45

(62)

(3H, d, J_p , $OCH_3=11.7Hz$, $P-OCH_3$); 3.12 (4H, m, モルホリノプロトン); 2.47 (1H, d, d , $J_{gem}=13.3Hz$, $J_{6,6a}=15Hz$, H_6); 2.26 (1H, d, d , $J_{gem}=11.7Hz$, $J_{6,6a}=5.0Hz$, H_6), 1.52 (8H, 複合 m, $2 \times H_7$, $2 \times H_8$, $2 \times H_9$, $2 \times H_{10}$).

d) [N^1 - (4, 4'-ジメトキシトリチル) ビオチノリル] ヒドロキシ [5'- (インターフェロン- α_2 -55)] ホスフィンオキシド (G)

制御細孔ガラス製支持体に結合した完全に保護されたインターフェロン- α_2 -55配列 (C) を実施例1、(d)部の記載に従って製造した。上記(d)で得た [N^1 - (4, 4'-ジメトキシトリチル) ビオチノリル] メトキシモルホリノホスフィン (H) をアブライド・バイオシステムズ380A-DNA合成装置による改良された結合反応において通常のヌクレオチドの代わりに使用して、上記オリゴデオキシリボヌクレオチド配列インターフェロン- α_2 -55の5'末端に付加させ、前記のようにオリゴデオキシリボヌクレオチド配列が完全に保護

(63)

実施例 3.

ビオチノリルヒドロキシ [5'- (インターフェロン- α_2 -55)] ホスフィンオキシド (A)

後記により得られるヒドロキシ [5'- (インターフェロン- α_2 -55)] - N^1 - (6-メトキシテトラヒドロピラン-2-イル) ビオチノリルホスフィンオキシド (L) を塩酸 (0.1N, 600 μ L) で処理し、混合物を22℃に45分間放置した。水酸化アンモニウム (比重0.91, 126 μ L) を添加し、表題のビオチニル化オリゴヌクレオチド (A) を次いで実施例1に示した高圧液体クロマトグラフィー (HPLC) により精製した。

1回目のパーティシル10-SAXによるHPLC (60%ホルムアミド、0-100%、~~1-27-cm~~ (50')において、直線濃度勾配) により表題のビオチニル化オリゴヌクレオチド (A) を母体オリゴヌクレオチド (C) の2.15分と比較して最も長時間保持される、保持時間2.22分のピークとして得た。2回目の μ -ボンダパックC-18によるHPLC (10-40%、~~約10-2-cm~~

(65)

された N^1 - (4, 4'-ジメトキシトリチル) ビオチノリル [5'- (インターフェロン- α_2 -55)] メトキシホスフィン (J) を得た。

この改良された結合反応は下記の工程からなっていた。 [N^1 - (4, 4'-ジメトキシトリチル) ビオチノリル] メトキシモルホリノホスフィン (H) (100mg) を無水 CH_3CN と3回共沸させ、次いで1:2-ジクロロエタン (333 μ L); CH_3CN (222 μ L) に溶解した。

アブライド・バイオシステムズ合成装置小規模合成プログラム $\alpha b b c$ 103、結合工程 3×100 秒 (普通法 1×30 秒)、キャッピング工程なし、続いてホスフィト基をヨウ素酸化してホスフェート (K) を得た。ホスフェート保護基を除去し、オリゴヌクレオチドを合成装置上で水酸化アンモニウム (比重0.91) により支持体から開裂させ、次いで比重0.910のアンモニアで処理することにより塩基保護基を除去し (50℃、4~5時間)、表題のホスフィンオキシド (G) を得た。これをそのまま次の工程に用いた。

(64)

(40'において) はそれぞれ17.5および16.0分の保持時間を与えた。

出発物質として用いて保護されたビオチニル化オリゴヌクレオチドは下記により製造された。

a) N^1 - (6-メトキシテトラヒドロピラン-2-イル) ビオチルメチルエステル

実施例1、(a)部に記載した方法を、2, 3-ジヒドロ-4H-ピランの代わりに2, 3-ジヒドロ-2-メトキシ-4H-ピランを用いて反復した。粗生成物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (メルク・キーセルゲル60, Art 9385) により、塩化メチレン:メタノール (94:6 v/v) を溶離剤として用いて精製した。適宜な画分から溶剤を除去したのち表題の化合物を22%の収率で得た。NMRデータは以下のとおりであった。

δ (CDCl₃, 300MHz) 5.78および5.63 (1H, 2s, NHプロトン), 5.46 (1H, d, d , メトキシTHPプロトン); 4.77 (1H, br. d, メトキシTHPプロトン); 4.48 (1H, 複合 m,

(66)

H_{α}); 4.22 (1H, 複合 m , H_{α}); 3.68 (3H, s , メチルエステルプロトン); 3.68 (3H, d , メトキシTHPプロトン); 3.44 (3H, d ; メトキシTHPプロトン); 3.18 (1H, 複合 m , H_{β}); 2.86 (2H, 複合 m , $2 \times H_{\beta}$); 2.32 (2H, t , $2 \times H_{10}$); 1.58 (12H, m , メトキシTHPプロトンおよび $2 \times H_7$, $2 \times H_8$ および $2 \times H_9$).

b) N^1 -(6-メトキシテトラヒドロピラン-2-イル)ピオチノール

実施例1、(b)部に記載した方法を、 N^1 -(テトラヒドロピラン-2-イル)ピオチンメチルエステルの代わりに N^1 -(6-メトキシテトラヒドロピラン-2-イル)ピオチンメチルエステルを用いて反復して表題の化合物を42%の収率で得た。質量イオン($M+H$) $^+$ =345。

c) メトキシ[N^1 -(6-メトキシテトラヒドロピラン-2-イル)ピオチノリル]モルホリノホスフィン(M)

実施例1、(c)部に記載の方法を、 N^1 -(テトラ

[5'-(インターフェロン- α_2 -55)]メトキシ- N^1 -(6-メトキシテトラヒドロピラン-2-イル)ピオチノリルホスフィン(N)を得た。改良された結合反応は以下の工程からなっていた。

メトキシ[N^1 -(6-メトキシテトラヒドロピラン-2-イル)ピオチノリル]モルホリノホスフィン(M) (78mg)を無水 CH_3CN と3回共沸させ、次いで1,2-ジクロルエタン(360 μ L): CH_3CN (240 μ L)に溶解した。

アブライド・バイオシステムズ合成装置小規模合成プログラム $\alpha\beta\delta\epsilon 103$ 、結合工程 3×100 秒(普通法 1×30 秒)、キャッピング工程なし、続いてホスフィット基をホスフェートにヨウ素酸化(P)。ホスフェート保護基を除去し、オリゴヌクレオチドを合成装置上で水酸化アンモニウム(比重0.91)により支持体から開裂させ、次いで比重0.910のアンモニアで処理することにより塩基保護基を除去し(50℃、4~5時間)、表題のホスフィンオキシド(L)を得た。次いで1.5mlの15% $EtOH$ 、 H_2O に入れ、これをそ

(69)

ヒドロピラン-2-イル)ピオチノールの代わりに N^1 -(6-メトキシテトラヒドロピラン-2-イル)ピオチノールを用い、溶離剤としてトリエチルアミン:酢酸エチル(7:3、 v/v)の代わりにトリエチルアミン:酢酸エチル(4:1、 v/v)を用いて、表題の化合物(M)を20%の収率で得た。質量イオン($M+H$) $^+$ =492。

d) ヒドロキシ[5-(インターフェロン- α_2 -55)]- N^1 -(6-メトキシテトラヒドロピラン-2-イル)ピオチノリルホスフィンオキシド(L)

前記において製造された、制御細孔ガラス製支持体に結合した完全に保護されたインターフェロン- α_2 -55配列をアブライド・バイオシステムズ380A-DNA合成装置による改良された結合反応における通常のヌクレオチドホスホルアミダイトの代わりに使用し、オリゴデオキシリボヌクレオチド配列インターフェロン- α_2 -55(C)の5'末端に付加させて、前記のようにオリゴデオキシリボヌクレオチド配列が完全に保護された

(68)

のまま次の工程に用いた。

本発明のピオチニル化オリゴヌクレオチドのアビジン-アガロース結合法は下記により示される。緩衝液(PBS 、0.1%ツウween 20) 0.5ml中のピオチニル化オリゴヌクレオチドを、アビジン7.4単位を含むアビジン-アガロース(シグマ・ケミカル・カンパニー)のカラム(0.2ml)に添加した。このカラムを PBS 、0.1%ツウweenで洗浄し、画分(0.5ml)を採取した。母体オリゴヌクレオチド配列インターフェロン- α_2 -55(C)に遅滞なくカラムを通過した。

a) 実施例2で製造したピオチニル化オリゴヌクレオチド(A) (0.43 OD_{260} 単位)の緩衝液中の溶液をアビジン-アガロースカラムに施した。合計0.06 OD_{260} 単位がカラムから回収された。従って保持された(A)の割合は86%であった。

b) 実施例3で製造した(A)の緩衝液中の溶液(0.25 OD_{260} 単位)をアビジン-アガロースカラムに施した。合計0.041 OD_{260} 単位がカラムから回収された。従って保持された(A)の割

(70)

合は84%であつた。

c) 保護されたビオチニル化オリゴヌクレオチド(L)の緩衝液中の溶液(0.294 OD_{260} 単位)をカラムに施した。合計0.222 OD_{260} 単位がカラムから回収された。従つて保持された(L)の割合は24%であつた。

d) 実施例1で製造した(A)の緩衝液(0.5ml)中の溶液(0.42 OD_{260} 単位)を前記に従つてアビジン-アガロースカラム(0.55ml; アビジン21単位)に施した。合計0.076 OD_{260} 単位がカラムから回収された。従つて保持された(A)の割合は82%であつた。

ハイブリダイゼーション試験例

プラスミド1205 (α_2 インターフェロン遺伝子配列を含む)および P_8 (α_2 インターフェロン同族体の遺伝子配列を含む)(たとえば欧州特許出願公開第202758号明細書を参照されたい)の系列希釈液をニトロセルロース(シュライヘル・アンド・シュル, BA85-SB)上にシュライヘル・シュル・ミニフォールドIIにスポツ

(71)

れた。

一夜ハイブリダイゼーションしたのちフィルターを室温で6×SSC、0.6%ピロリン酸ナトリウム、20mMリン酸ナトリウム、pH7中において2回洗浄し(各洗浄は5分間続けられた)、次いで同一緩衝液中において1回、40℃で3分間洗浄した。ハイブリダイズしたプローブのスポットをBRL-DNA検出キット(カタログ#82395A)により可視状態にした。要約すると、フィルターにつき下記のインキュベーションを行つた。

1. 室温、1分間、0.1Mトリス・HCL pH7.5、0.1M NaCL, 2mM MgCL₂, 0.05% (v/v) トライトンX-100中(緩衝液1)
2. 37℃、20分間、緩衝液1中の3% (v/v) BSA(緩衝液2)
3. 室温、10分間、2 μ g/ml のストレプトアビジンを含有する緩衝液1中(溶液約3ml/100cm²・ニトロセルロース)。
4. 緩衝液1中で3分間の室温洗浄。
5. 4と同じ。

(73)

トした(第1スポット1 μ g、以下は3倍の希釈液)。スポットする前に各プラスミド希釈液は300 μ Lの0.2M・NaOH、7×SSC、56mMトリスHCL、pH7.4中で100℃において10分間アルカリ変性され、次いで氷浴中で冷却され、70 μ Lの1MトリスHCL、pH7.0の添加により中和された。このDNAはニトロセルロースを80℃で2時間、真空下にベーキングすることにより固定化された。

フィルターは5×デンハルト試薬、5×SSC、50mMリン酸ナトリウム、pH7.0、1%グリシン、0.1%SDS、100 μ g/ml 音波処理し、煮沸したニシン精液DNA中で予備ハイブリダイズされた。ハイブリダイゼーションは室温で一夜、5×SSC、0.5%ノニデットP40(BDH56009)、250 μ g/ml tRNA(シグマ・タイプX-5、RO128)中で、オリゴヌクレオチドが50倍モル過剰に存在する状態において行われた。予備ハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションはシールしたプラスチックバッグ中で行わ

(72)

6. 5と同じ。
7. 室温、10分間、1 μ g/mlのビオチニル化アルカリホスファターゼを含有する緩衝液1中(溶液約3ml/100cm²・ニトロセルロース)
8. 緩衝液1中で3分間の室温洗浄。
9. 8と同じ。
10. 0.1Mトリス・HCL(pH9.5)、0.1M NaCL, 50mM MgCL₂(緩衝液3)中で3分間の室温洗浄。
11. 10と同じ。
12. 室温、アルカリホスファターゼ基質溶液NBT/BCIP(緩衝液3中)(たとえばレアリー(Leary)ら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA.(1983)、80、4046に記載)。

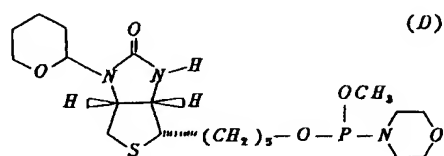
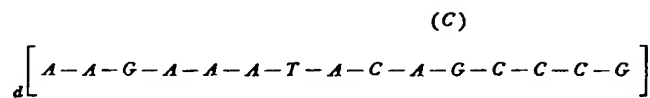
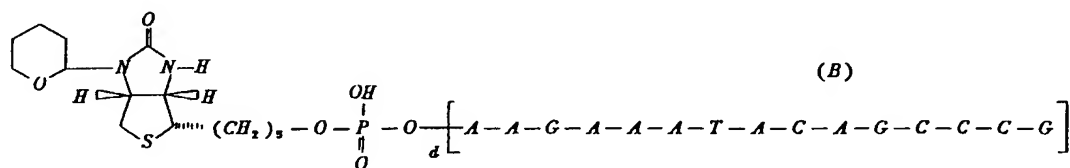
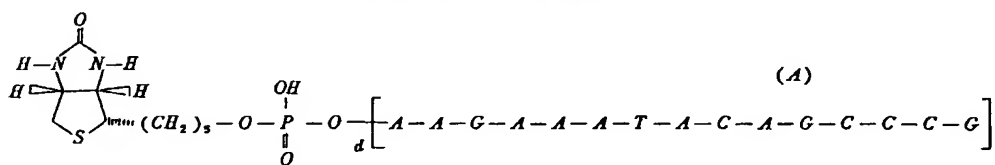
インキュベーション1-11はサンドイッチボックス中で行われた。基質インキュベーション12はシールしたプラスチックバッグ中で暗所において行われた。1/2時間発色させたのち、37 μ gの1205スポットがフィルター上で可視状態となった。この同族体の不整合(mismatch)により

(74)

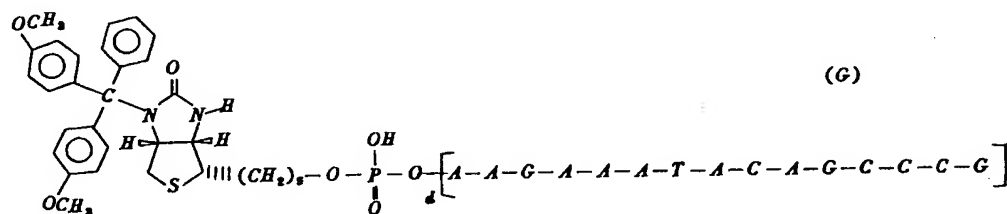
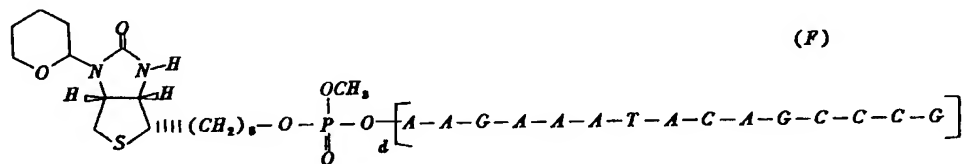
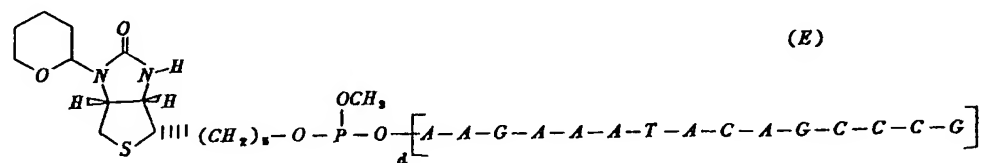
起こるハイブリッドの不安定化によつて、可視状態となるF6スポットはこれより少なかった。

(75)

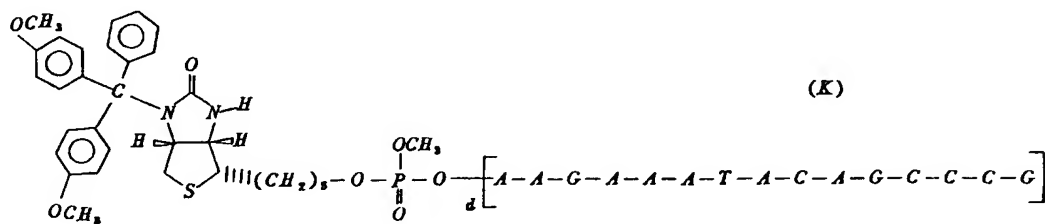
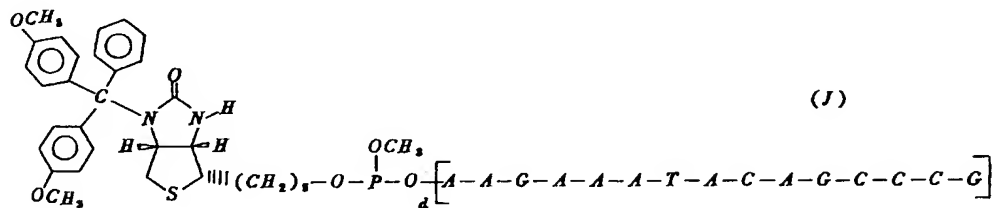
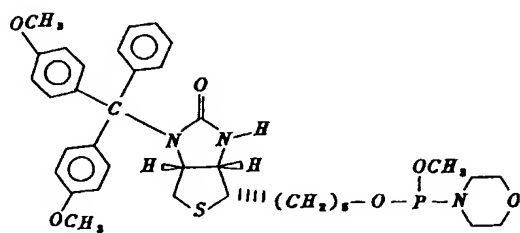
実施例で述べた構造式



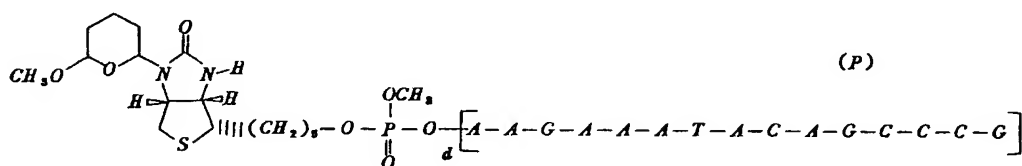
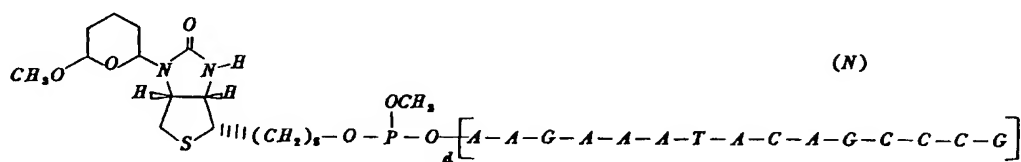
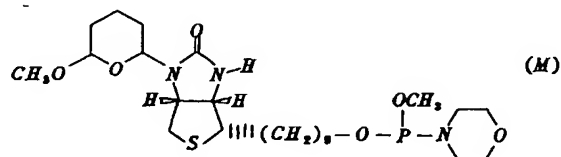
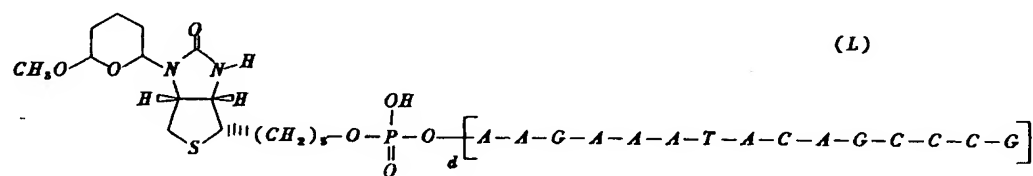
(76)



(77)

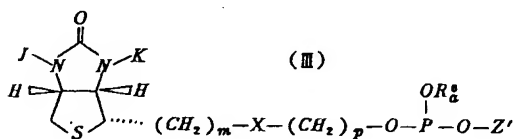
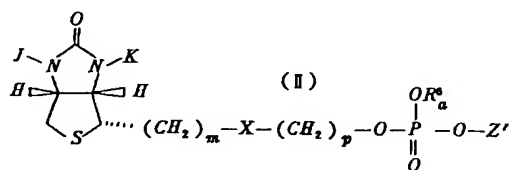
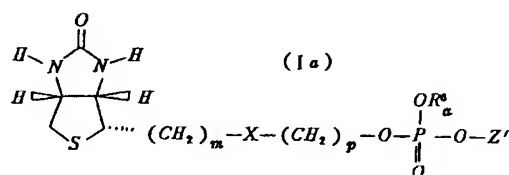
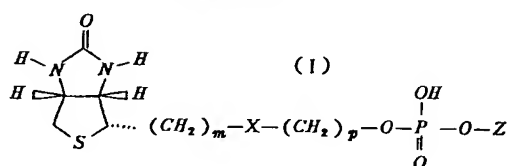


(78)

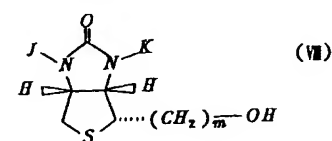
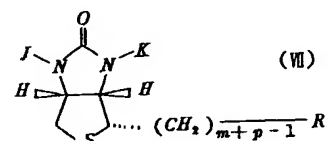
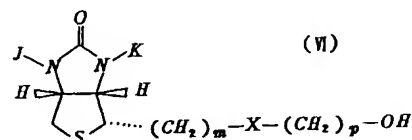
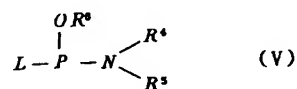
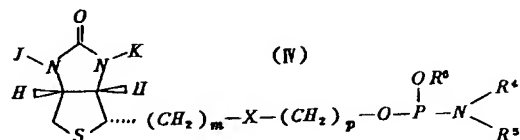


(79)

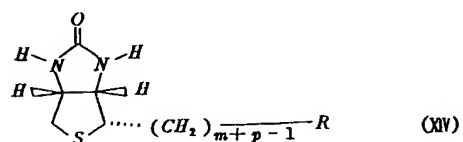
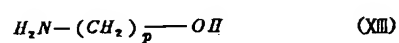
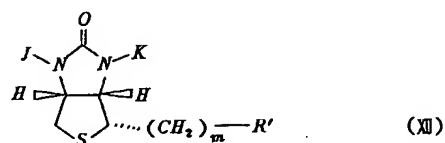
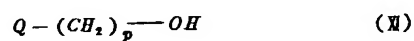
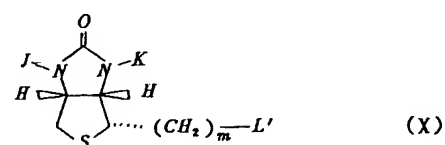
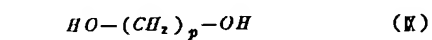
構造式



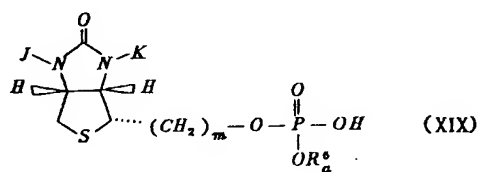
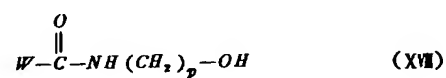
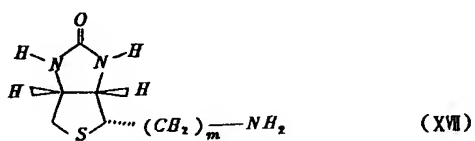
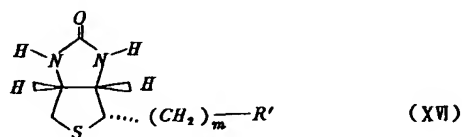
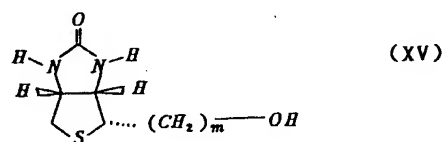
(80)



(81)



(82)



(83)